

PN - WO0017340 A1 20000330
 TI - PROCESS FOR PRODUCING POLY-3-HYDROXYALKANOIC ACID
 AB - A process for producing a poly-3-hydroxyalkanoic acid characterized by transferring a poly-3-hydroxyalkanoic acid polymerase gene and a fatty acid synthase gene into a host microorganism to thereby transform the host, proliferating the resultant transformant microorganism in the presence of a carbon source, and then isolating and purifying the poly-3-hydroxyalkanoic acid from the thus proliferated microorganism; and a transformant microorganism constructed by transferring a poly-3-hydroxyalkanoic acid polymerase gene and a fatty acid synthase gene into a host microorganism. Thus, a highly pure poly-3-hydroxyalkanoic acid, which is useful as a material for producing substitute plastics etc., can be conveniently and economically produced in a large amount.
 EC - C12P7/62A
 PA - JAPAN SCIENCE & TECH CORP [JP]; RIKAGAKU KENKYUSHO [JP]; TAGUCHI KAZUNORI [JP]; FUKUI TOSHIAKI [JP]; DOI YOSHIHARU [JP]
 IN - TAGUCHI KAZUNORI [JP]; FUKUI TOSHIAKI [JP]; DOI YOSHIHARU [JP]
 CT - WO9722711 A1 [Y]; JP3272680 A [Y]; JP63056281 A [Y]; JP11276180 A [AE]; XP002925767 A [Y]; XP002925768 A [Y]
 CTNP - [Y] MARK D. WILLIAMS ET AL.: 'Expression and Analysis of a Bacterial Poly (hydroxyalkanoate) Synthase in Insect Cells Using a Baculovirus System' PROTEIN EXPR. PURIF., vol. 7, no. 2, 1996, pages 203 - 211, XP002925767 [Y] MARK D. WILLIAMS ET AL.: 'Production of a Polyhydroxyalkanoate Biopolymer in Insect Cells with a Modified Eucaryotic Fatty Acid Synthase' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 7, 1996, pages 2540 - 2546, XP002925768
 AP - WO1999JP05185 19990922
 PR - JP19980268791 19980922
 DT - *
 IC - C12N15/09; C12N1/21; C12P7/62; C12P7/62; C12R1/19; C12N1/21; C12R1/19

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/09, C12P 7/62, C12N 1/21 // (C12P 7/62, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO00/17340 (43) 国際公開日 2000年3月30日(30.03.00)		
<table border="0"><tr><td data-bbox="102 514 706 682">(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05185 (22) 国際出願日 1999年9月22日(22.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/268791 1998年9月22日(22.09.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0106 埼玉県和光市広沢2-1 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 田口一徳(TAGUCHI, Kazunori)[JP/JP] 〒351-0022 埼玉県朝霞市東弁財1-7-2 アクシス905 Saitama, (JP) 福居俊昭(FUKUI, Toshiaki)[JP/JP] 土肥義治(DOI, Yoshiharu)[JP/JP] 〒351-0106 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内 Saitama, (JP)</td><td data-bbox="706 514 1299 682">(74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書</td></tr></table>			(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05185 (22) 国際出願日 1999年9月22日(22.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/268791 1998年9月22日(22.09.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0106 埼玉県和光市広沢2-1 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 田口一徳(TAGUCHI, Kazunori)[JP/JP] 〒351-0022 埼玉県朝霞市東弁財1-7-2 アクシス905 Saitama, (JP) 福居俊昭(FUKUI, Toshiaki)[JP/JP] 土肥義治(DOI, Yoshiharu)[JP/JP] 〒351-0106 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内 Saitama, (JP)	(74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05185 (22) 国際出願日 1999年9月22日(22.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/268791 1998年9月22日(22.09.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0106 埼玉県和光市広沢2-1 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 田口一徳(TAGUCHI, Kazunori)[JP/JP] 〒351-0022 埼玉県朝霞市東弁財1-7-2 アクシス905 Saitama, (JP) 福居俊昭(FUKUI, Toshiaki)[JP/JP] 土肥義治(DOI, Yoshiharu)[JP/JP] 〒351-0106 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内 Saitama, (JP)	(74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書			
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING POLY-3-HYDROXYALKANOIC ACID (54) 発明の名称 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の製造法 (57) Abstract A process for producing a poly-3-hydroxyalkanoic acid characterized by transferring a poly-3-hydroxyalkanoic acid polymerase gene and a fatty acid synthase gene into a host microorganism to thereby transform the host, proliferating the resultant transformant microorganism in the presence of a carbon source, and then isolating and purifying the poly-3-hydroxyalkanoic acid from the thus proliferated microorganism; and a transformant microorganism constructed by transferring a poly-3-hydroxyalkanoic acid polymerase gene and a fatty acid synthase gene into a host microorganism. Thus, a highly pure poly-3-hydroxyalkanoic acid, which is useful as a material for producing substitute plastics etc., can be conveniently and economically produced in a large amount.				

(57)要約

この出願の発明は、ポリー３－ヒドロキシアルカン酸重合酵素遺伝子と、脂肪酸合成酵素遺伝子とを宿主微生物に導入して形質転換し、この形質転換微生物を炭素源存在下で増殖させ、この増殖微生物からポリー３－ヒドロキシアルカン酸を単離・精製することを特徴とするポリー３－ヒドロキシアルカン酸の製造方法を提供する。またこの出願の発明は、ポリー３－ヒドロキシアルカン酸重合酵素遺伝子と、脂肪酸合成酵素遺伝子とを宿主微生物に導入することによって作出された形質転換微生物を提供する。これらの発明によって、代替プラスチック等の原料として有用な高純度のポリー３－ヒドロキシアルカン酸を簡便かつ大量に、しかも安価に製造することが可能となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	ニカラガ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
		KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸の製造法

5 技術分野

この出願の発明は、ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸の製造方法と、このポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を大量に産生する遺伝子組換え生物に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、代替プラスチック等として有用な高純度のポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を簡便かつ大量に、しかも安価に製造する方法と、

10 この方法に用いる新規生物に関するものである。

背景技術

ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸（以下、「P(3HA)」と記載することがある）は、３－ヒドロキシアルカン酸の２以上がエステル結合等により重合した化合物の総称
15 であり、例えば、ポリ－３－ヒドロキシブタン酸、ポリ－３－ヒドロキシヘキサン酸等がある。

この P(3HA)は、近年、代替プラスチック等への利用が有望視されているが、化学合成による製造はコスト高となるため、バイオリアクター等による遺伝子工学的製造方法が検討されている。

20 この遺伝子工学的方法による P(3HA)の製造では、P(3HA)を蓄積しない大腸菌等の宿主生物に他の生物由来の P(3HA)重合酵素の遺伝子を導入して宿主生物を形質転換し、この形質転換体をグルコース等の炭素源を含む培地で培養する方法が試みられてきた。大腸菌等の P(3HA)非蓄積生物は、その重合酵素を産生しないために P(3HA)を蓄積しないと考えられるからである。

25

しかしながら、P(3HA)非蓄積生物に重合酵素遺伝子を導入しただけではその形質転換体における P(3HA)蓄積能を増大させることはできないことから、大腸菌等における P(3HA)の非蓄積性は、その生物が P(3HA)重合酵素を産生しないことだけでは

なく、ポリ-3-ヒドロキシアリカン酸重合酵素の基質となる3-ヒドロキシアシル CoA の産生能が極めて低いことによるものであると推測されている。そこで、P(3HA)重合酵素遺伝子とともに、3-ヒドロキシアシル CoA の産生を促進するための脂肪酸合成酵素遺伝子を宿主生物に導入することが試みが報告されている

5 (Williams 等: Protein Expr. Purif. 7:203-211, 1996)。この従来方法では、ラット由来の脂肪酸合成酵素の変異遺伝子と、*Alcaligenes eutrophus* 由来のポリ-3-ヒドロキシアリカン酸重合酵素遺伝子とを昆虫 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞に導入し、昆虫細胞用培地で3日間培養した結果、培地1リットル当たり600 mgの乾燥細胞、1 mgのポリ-3-ヒドロキシアリカン酸を得ることに成功している。

10 しかしながら、Williams 等の従来方法では、得られるP(3HA)は、乾燥細胞重量当たり0.17%と極めて少量であり、工業的規模での大量製造には適さない。また、宿主生物が昆虫細胞であるため、培養に特別な技術を必要とするといった問題点も存在した。

15 この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、従来方法の問題点を解消し、高純度のP(3HA)を簡便かつ大量に、しかも安価に製造することのできる新しいP(3HA)製造方法を提供することを課題としている。

またこの出願の発明は、この製造方法に用いる遺伝子組換え生物を提供することを課題としている。

20

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決する発明として、P(3HA)重合酵素遺伝子と、脂肪酸合成酵素遺伝子とを宿主微生物に導入して形質転換し、この形質転換微生物を炭素源存在下で増殖させ、この増殖微生物からP(3HA)を単離・精製することを特徴とするP(3HA)の製造方法を提供する。

25

またこの出願は、P(3HA)重合酵素遺伝子と、脂肪酸合成酵素遺伝子とを宿主微生物に導入することによって作出された形質転換微生物を提供する。

なお、これらの発明においては、宿主微生物が大腸菌であることを好ましい態様としている。

また、脂肪酸合成酵素遺伝子が微生物由来の脂肪酸合成酵素遺伝子群を構成する
5 遺伝子の1種または2種以上であること、そしてこの場合の微生物が大腸菌であることを別の好ましい態様としてもいる。

さらにこの出願は、前記の方法に使用する発現ベクターとして、グラム陰性細菌用広宿主域発現ベクター pJRDTrc1 を提供する。

10

図面の簡単な説明

第1図は、この発明に用いることのできる pJRDTrc1 の構成を示した模式図である。

第2図は、実施例で構築した脂肪酸合成酵素遺伝子発現ベクターの挿入遺伝子の関係を示した模式図である。

15

発明を実施するための最良の形態

この発明の方法に使用する P(3HA)重合酵素遺伝子は、各種の P(3HA)蓄積生物に由来する遺伝子を用いることができる。そのような遺伝子としては例えば、*Aeromonas caviae* 由来の P(3HA)重合酵素遺伝子 *phaCAc* (Fukui et al., J. Bacteriol.
20 179:4821-4830, 1997)、*Alcaligenes eutrophus* 由来の P(3HA)重合酵素遺伝子 *phbCAe* (Peoples et al., J. Biol. Chem. 262:15298-15303, 1989)、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の重合酵素遺伝子 *phaC1Pa* (Timm et al., Eur. J. Biochem. 209:15-30, 1992) 等である。

あるいは、これらの公知遺伝子をプローブとして、任意生物種のゲノム DNA から
25 単離した P(3HA)重合酵素遺伝子を用いることもできる。

これらの P(3HA)重合酵素遺伝子は、微生物用の発現ベクターに組み込み、この組換えベクターを定法に従って大腸菌等の微生物に導入することによって形質転換微

生物を作出することができる。発現ベクターは、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、遺伝子クローニング部位、ターミネーター等を有する公知の微生物用発現ベクター（例えば、大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システム）などを用いることができる。また、この出願の発明者らが新たに構築したプラスミドベクター pJRDTrc1（第1図）を用いることもできる。この pJRDTrc1 は、第1図に示したように、市販の pTrc99A と pJRD215 とを組み合わせで構築した新規ベクターであり、そのマルチクローニングサイトに前記の P(3HA)重合酵素遺伝子 *phaCAc* 等を確実に連結することができる。

この発明の方法に使用する脂肪酸合成酵素遺伝子は、真核生物や微生物由来の公知の遺伝子である。例えば、大腸菌 *Escherichia coli* 由来の脂肪酸合成酵素遺伝子 *fab* (Battner et al., Science 277:1453-1474, 1997)、*Bacillus subtilis* 由来の脂肪酸合成酵素遺伝子 *fab* (Kunst et al., Nature 390:249-256, 1997) 等であり、これらを単独もしくは複数組み合わせで使うことができる。

このような脂肪酸合成酵素遺伝子（群）は、前記 P(3HA)重合酵素遺伝子と同様に、公知の微生物用発現ベクターに組み込んで宿主細胞に導入することができる。

以上のとおりに構築した P(3HA)重合酵素遺伝子発現ベクターおよび脂肪酸合成酵素発現ベクターは、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法により同一の宿主微生物に導入する。そして、発現ベクター中の耐性遺伝子による薬剤耐性等を用いて両遺伝子により形質転換した微生物を単離することができる。

このようにして作出した形質転換微生物を、炭素源存在下で、必要に応じて遺伝子の発現誘導処置を施すなどして増殖させることにより、微生物体内に P(3HA)を蓄積させることができる。炭素源は、グルコースやフラクトース等の糖類、または脂肪酸類を制限なく用いることができる。

蓄積された P(3HA)は公知の方法により単離・精製することができる。例えば、大腸菌の場合には、培養液から遠心分離等により菌体を集め、これを凍結乾燥し、乾燥菌体を酸-メタノール分解し、分解物からクロロホルム抽出によって P(3HA)を単離することができる。そして、各種クロマトグラフィー等により精製することができる。

以下、実施例を示し、この発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

10 実施例

P(3HA)重合酵素遺伝子 (*Aeromonas caviae* FA440 株由来の *phaCAc* 遺伝子) を pJRDTrc1 に組み込み、P(3HA)重合酵素遺伝子発現ベクターを構築した (第 1 図)。一方、*Escherichia coli* HB101 株由来の脂肪酸合成酵素遺伝子 *fabH*、*fabD*、*fabG*、*acpP* および *fabF* 遺伝子群を連続して pUC118 にクローニングし、このクローンから第 2 図に示したように、*fabH* を含む断片、*fabD* を含む断片、および全遺伝子群を含む断片を切り出し、各々を pBluescriptII KS(+)に組み込んで脂肪酸合成酵素遺伝子発現ベクター (それぞれ、pXbH 1.0、pEEv1.6、pXbSac5.0) を構築した。

P(3HA)重合酵素遺伝子発現ベクターと脂肪酸合成酵素遺伝子のいずれかを組み合わせ、*Escherichia coli* HB101 株に同時に導入し、形質転換大腸菌を得た。

これらの形質転換菌を LB (Luria-Bertani) 培地において 30°C で 12 時間培養した後、遺伝子発現誘導剤として IPTG (Isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) を最終濃度 1 mM になるように添加して 4 時間培養した。次いで、グルコース (最終濃度 10 g/リットル) を添加し、さらに 24 時間培養した。

培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、凍結乾燥し、乾燥菌体を酸-エタノール分解し、クロロホルム抽出した後、ガスクロマトグラフィーで P(3HA)の収量およびその組成比を検出した。

なお、比較対照として、*phaCAc* 遺伝子のみを導入した遺伝子組換え大腸菌についても同様に培養し、P(3HA)の有無を調べた。

結果は表 1 に示したとおりである。P(3HA)重合酵素遺伝子と脂肪酸合成酵素遺伝子群とを導入した形質転換菌からは、モノマーユニットが R-3-ヒドロキシブタン酸:100%の 3HB ホモポリマーが得られたのに対し、比較対象として試験した *phaC*Ac 遺伝子のみを導入した形質転換菌からはポリ-3-ヒドロキシアルカン酸は検出されなかった。また、3HB の収率は、*fabH*、*fabD*、*fabG*、*acpP* および *fabF* 遺伝子群を全て導入した菌が乾燥菌体重量当たり 10.3%と最も高く、次いで、*fabH* (6.3%)、*fabD* (4.6%) であった。

表 1

strain	CDW (g/l)	PHA content (%)	PHA composition (mol%)				
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD
<i>E. coli</i> HB101 (<i>phaC</i> Ac) control	1.8	N.D.	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> HB101 (pJRDTrc: <i>phaC</i> Ac+pXbH1.0)	2.0	6.5	100	0	0	0	0
<i>E. coli</i> HB101 (pJRDTrc: <i>phaC</i> Ac+pEEv1.6)	2.1	4.6	100	0	0	0	0
<i>E. coli</i> HB101 (pJRDTrc: <i>phaC</i> Ac+pXbSac5.0)	1.7	10.3	100	0	0	0	0

N.D.: Not Detected

産業上の利用可能性

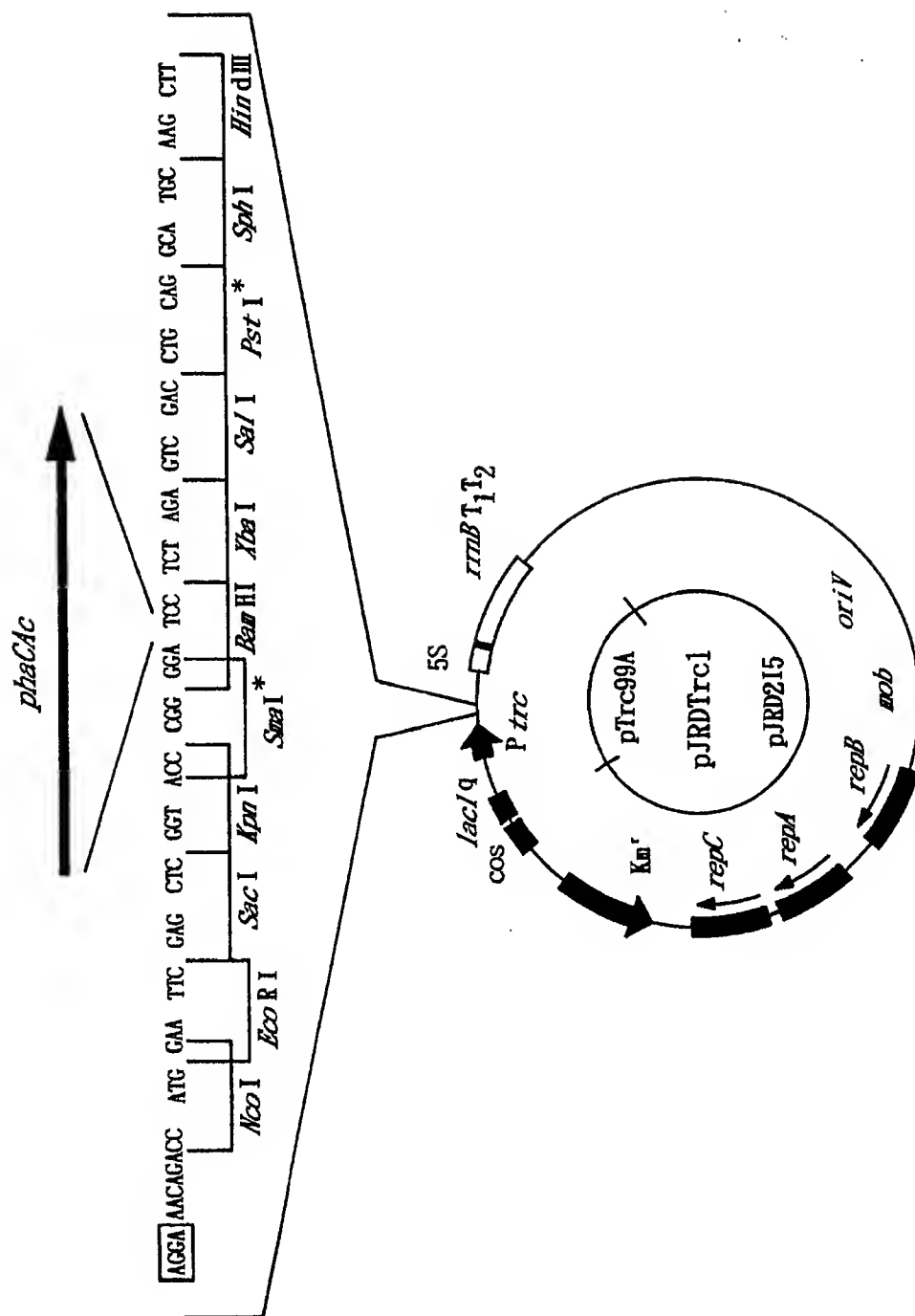
以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、P(3HA)の遺伝子工学的手法による製造方法と、この製造方法に用いる遺伝子組換え生物が提供される。これらの発明によって、代替プラスチック等の原料として有用な高純度のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を簡便かつ大量に、しかも安価に製造することが可能となる。

請求の範囲

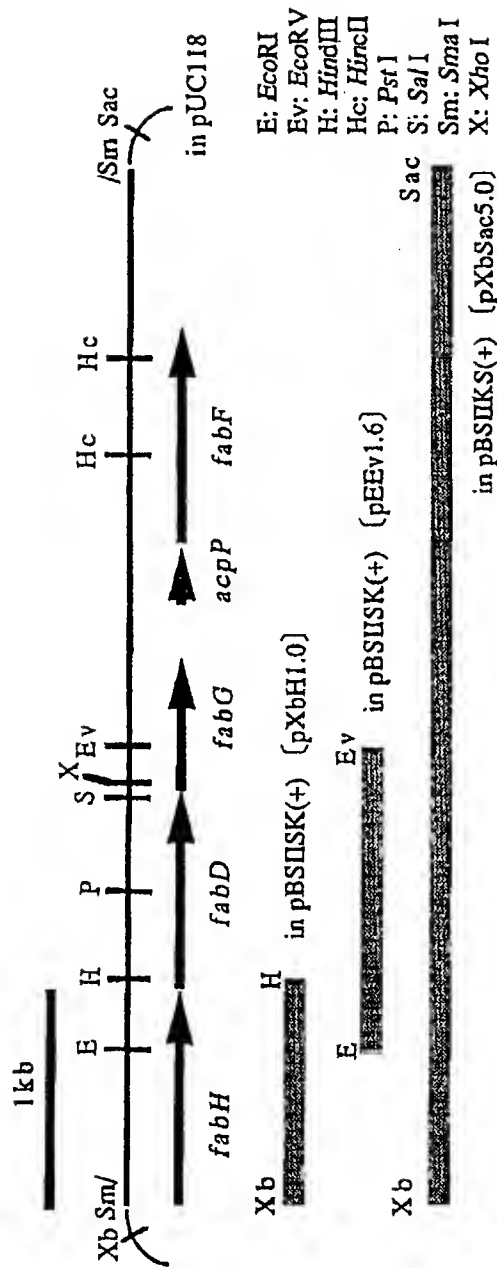
1. ポリ－３－ヒドロキシアリカン酸重合酵素遺伝子と、脂肪酸合成酵素遺伝子とを宿主微生物に導入して形質転換し、この形質転換微生物を炭素源存在下で増殖
5 させ、この増殖微生物からポリ－３－ヒドロキシアリカン酸を単離・精製することを特徴とするポリ－３－ヒドロキシアリカン酸の製造方法。
2. 宿主微生物が大腸菌である請求項 1 の製造方法。
- 10 3. 脂肪酸合成酵素遺伝子が微生物由来の脂肪酸合成酵素遺伝子群を構成する遺伝子の 1 種または 2 種以上である請求項 1 または 2 の製造方法。
4. 微生物が大腸菌である請求項 3 の製造方法。
- 15 5. ポリ－３－ヒドロキシアリカン酸重合酵素遺伝子と、脂肪酸合成酵素遺伝子とを宿主微生物に導入することによって作出された形質転換微生物。
6. 宿主微生物が大腸菌である請求項 5 の形質転換微生物。
- 20 7. 脂肪酸合成酵素遺伝子が微生物由来の脂肪酸合成酵素遺伝子群を構成する遺伝子の 1 種または 2 種以上である請求項 5 または 6 の形質転換微生物。
8. 微生物が大腸菌である請求項 7 の形質転換微生物。
- 25 9. グラム陰性細菌用広宿主域発現ベクター pJRDTrc1。

1/2

第1図



第2図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N 15/09, C12P 7/62, C12N 1/21//
(C12P 7/62, C12R 1:19), (C12N 1/21, C12R 1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N 15/09, C12P 7/62, C12N 1/21//
(C12P 7/62, C12R 1:19), (C12N 1/21, C12R 1:19)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mark, D. Williams et al., "Expression and Analysis of a Bacteri-al Poly (hydroxyalkanoate) Synthase in Insect Cells Using a Baculovirus System", Protein Expr. Purif. (1996) Vol. 7, No. 2, pages 203-211	1-9
Y	Mark, D. Williams et al., "Production of a PolyhydroxyalkanoateBiopolymer in Insect Cells with a Modified Eucaryotic Fatty Acid Synthase", Applied and environmental Microbiology (1996), Vol. 62, No. 7, pages 2540-2546	1-9
Y	WO, 97/22711, A (Univ Minnesota), 26 June, 1997 (26.06.97) & EP, 870053, A	1-9
Y	JP, 3-272680, A (Res. Assoc. Util. of Light Oil), 04 December, 1991 (04.12.91) (Family: none)	1-9
Y	JP, 63-56281, A (NIPPON KAYAKU CO., LTD.), 10 March, 1988 (10.03.88) (Family: none)	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 December, 1999 (09.12.99)

Date of mailing of the international search report
21 December, 1999 (21.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05185

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
EA	JP, 11-276180, A (RIKAGAKU KENKYUSHO), 12 October, 1999 (12.10.99), (Family: none)	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05185

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N 15/09, C12P 7/62, C12N 1/21//
(C12P 7/62, C12R 1:19), (C12N 1/21, C12R 1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N 15/09, C12P 7/62, C12N 1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Mark, D. Williams et al., "Expression and Analysis of a Bacterial Poly(hydroxyalkanoate) Synthase in Insect Cells Using a Baculovirus System", Protein Expr. Purif. (1996) Vol. 7, No. 2, p. 203-211	1-9
Y	Mark, D. Williams et al., "Production of a Polyhydroxyalkanoate Biopolymer in Insect Cells with a Modified Eucaryotic Fatty Acid Synthase", Applied and Environmental Microbiology (1996) Vol. 62, No. 7, p. 2540-2546	1-9
Y	WO, 97/22711, A (Univ Minnesota) 26.6 月. 1997 (26.06.97) & EP, 870053, A	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.12.99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



4N 9637

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-272680, A (軽質留分新用途開発技術研究組合) 4.12月.1991 (04.12.91) (ファミリーなし)	1-9
Y	JP, 63-56281, A (日本化薬株式会社) 10.3月.198 8 (10.03.88) (ファミリーなし)	1-9
EA	JP, 11-276180, A (理化学研究所) 12.10月.199 9 (12.10.99) (ファミリーなし)	1-9